Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

DER EINFLUSS VON DIURETICA AUF DIE ATPASE - AKTIVITÄT VON PLASMAMEMBRANEN DER RATTENNIERE.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jochen Ehrich
aus Braunschweig

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547025_0062

Aus dem Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

DER EINFLUSS VON DIURETICA AUF DIE ATPASE - AKTIVITÄT VON PLASMAMEMBRANEN DER RATTENNIERE.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
J o c h e n E h r i c h
aus Braunschweig

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Priv. Doz. Dr. med. H. Ebel

Korreferent: Professor Dr. med. Th. Günther

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

promoviert am: 3. Oktober 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methodik	2
1. Versuchstiere	2
2. Die Präparation von Plasmamembranen aus Rattennieren durch Differentialzentrifugation.	2
3. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der ATPase.	4
4. Versuche zur Wirkung der Diuretica.	7
5. Statistische Auswertung.	9
C. Ergebnisse	11
1. Einfluß von Diuretica auf die Diurese, Natriurese, Kaliurese und ATPase-Aktivität unter in vivo Bedingungen.	11
2. Einfluß von Diuretica auf die ATPase-Aktivität unter in vitro Bedingungen.	12
3. Einfluß der Diuretica auf die Kinetik der ATPase-Reaktionen	12
4. Tabellen	
D. Diskussion	14
I. Diskussion der Methoden	14
1. Die Präparation subzellulärer Strukturen.	
2. Die Präparation von Plasmamembranen.	16
3. Die Methoden zur Aktivitätssteigerung der NaK-ATPase.	18
II. Diskussion der Ergebnisse	20
E. Zusammenfassung	25
F. Literatur	

Abkürzungsverzeichnis

ATPase	= Adenosintriphosphat-Phosphohydrolase E.C.3.6.1.3.
Mg-ATPase	= Magnesium aktivierte ATPase
MgNaK-ATPase	= Magnesium, Natrium und Kalium aktivierte ATPase
NaK-ATPase	= Magnesium, Natrium, Kalium aktivierte ATPase minus Magnesium ATPase
ATP	= Adenosintriphosphat
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
Pi	= anorganisches Phosphat
Tris	= Tris- (hydroxymethyl) aminomethan

Einleitung

An dem aktiven Transport von Natrium und Kalium durch die Zellmembranen und epitheliale Zellagen soll das NaK-ATPase-System beteiligt sein (1,36,43,71). Dieses Enzym wurde nicht nur in Erythrocyten (34,60, 77) und Nervenmembranen (67,68), sondern auch in den Membranen von parenchymatösen und sekretorischen Organen nachgewiesen, wie z.B. Speicheldrüse, Darm, Pankreas, Salzdrüsen, Kiemen und Niere (6,28,30,62,66, 71). In der Niere wurde versucht, die Größe der Natrium-Reabsorption mit der NaK-ATPase-Aktivität zu korrelieren. Es wurde gezeigt, daß bei nebenniereninsuffizienten Ratten die verminderte Natrium-Reabsorption mit einer Abnahme der mikrosomalen NaK-ATPase-Aktivität verknüpft ist (41a). Weiter wurde bekannt, daß die durch Strophanthin ausgelöste Natriurese ebenfalls mit einer verminderten NaK-ATPase-Aktivität einhergeht (56). Eine Hemmung der mikrosomalen NaK-ATPase der Niere wurde auch nach Gabe verschiedener Diuretica sowohl unter in vivo als auch in vitro Bedingungen beobachtet (18,19,39,55,73). Es wurde deshalb angenommen, daß eine Hemmung der mikrosomalen NaK-ATPase Ursache der Natriurese sei (55).

Die aktive Na-Reabsorption findet nach allgemeinen Vorstellungen durch die Plasmamembranen (=Basal-Lateralmembranen)statt. Die Korrelation zwischen der Größe der Na-Reabsorption und der NaK-ATPase-Aktivität sollte daher mit der Plasmamembranfraktion erfolgen, denn die Mikrosomen enthalten kleinere Plasmamembranen lediglich als Verunreinigung (13).

Da es gelang, auch in renalen Plasmamembranen eine NaK-ATPase nachzuweisen (21,32), ist es möglich, die NaK-ATPase dieser Fraktion mit der renalen Natrium-Reabsorption zu vergleichen.
In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich eine Beziehung zwischen der Natriurese und der plasmamembran-gebundenen NaK-ATPase-Aktivität in der Rattenniere nachweisen läßt.

Es wurden 3 Diuretika gewählt, die nach oraler Gabe bei der Ratte unterschiedlich wirken. Furosemid wurde als ein starkes Natriuretikum und Amilorid als Natriuretikum mit anti-kaliuretischer Wirkung verwendet. Ethacrynsäure wurde ausgesucht als ein Diuretikum, das nur unter besonderen Versuchsbedingungen (80) nicht aber nach oraler Gabe (55) wirksam ist.

Der Einfluß dieser Diuretika auf die NaK-ATPase-

Aktivität der Plasmamembranen wurde sowohl nach oraler Gabe, wie auch in vitro untersucht. Außerdem wurden Diurese, Natriurese und Kaliurese gemessen.

B. Experimenteller Teil

I. Material und Methodik

1. Versuchstiere

Es wurde mit männlichen Wistar-Ratten des Inzuchtstammes F.W. 49 gearbeitet, die im halbdunklen Raum bei 25° C mit einer 12 stündigen Tagesperiode gehalten wurden. Die Ratten erhielten bis zum Versuchsbeginn Altromin R - Nahrung und Leitungswasser ohne Beschränkung. Das Körpergewicht der verwendeten Ratten betrug 180 - 220 g. Für die Experimente wurden Tiergruppen zusammengestellt, deren Körpergewicht auf ± 3 g genau war.

2. Die Präparation von Plasmamembranen aus Rattennieren durch Differentialzentrifugation.

A. Gewinnung der Nieren:

Sämtliche Arbeiten wurden im Kühlraum bei 0 - 1°C durchgeführt. Die Tiere wurden hier dekapitiert und entblutet. Anschließend wurden die Nieren entnommen, dekapsuliert und gewogen. Das Frischgewicht eines dekapsulierten Nierenpaares betrug 1,3 - 1,6 g.

B. Homogenisation der Nieren:

Die Nierenpaare wurden im Homogenisationsmedium (im Verhältnis 5 ml pro 1 g Niere) mit einer Schere zerkleinert. Das Homogenisationsmedium setzte sich zusammen aus:

Sucrose 250 mM/l
EDTA 2 mM/l (Tris gepuffert)
Imidazol 65 mM/l (HCl gepuffert)
pH = 7,9 (bei 22° C gemessen)

Die Nierenbrocken wurden mit einem motorgetriebenen Gerät vom Potter-Elvehjem Typ* mit einem lose verbundenem Teflonpestill

*Firma: Braun Apparatebau, Melsungen

in einem Pyrexgefäß von 15 ml Inhalt homogenisiert. Das Pyrexgefäß befand sich in einem Eisbad. Das Homogenat wurde durch ein Kunststoffsieb gefiltert, um unvollständig homogenisierte Gewebsreste abzutrennen. Der pH-Wert des Homogenates betrug pH 7.5.

C. Zentrifugation des Filtrates:

Das Filtrat wurde mit 700 g über 10 min in einer Christzentrifuge der Type Junior* 15000 zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 20 ml Pipetten vorsichtig abgesaugt, denen PVC-Kapillaren aufgesetzt waren. Das Zellkerne und Erythrocyten enthaltene Sediment wurde verworfen und der Überstand mit 700 g für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal ausgeführt. Im Phasenkontrastmikroskop zeigte sich, daß der Überstand frei von Zellkernen und Erythrocyten war. Der Überstand der dritten 700 g Zentrifugation wurde für 10 min mit 1500 g zentrifugiert. Im Sediment befanden sich Bruchstücke der Plasmamembranen und Teile der mitochondrialen Fraktion. Der mitochondrien- und mikrosomenhaltige Überstand wurde verworfen. Das 700 - 1500 g Sediment wurde in 7 ml einer Lösung von 1 mM/l EDTA (Tris-gepuffert, pH 7.5) im Homogenisator (von 5 ml Volumen) mit der Hand rehomogenisiert und ein zweites Mal mit 1200 g über 20 min gewaschen. Das Sediment wurde in 1 mM/l EDTA im Verhältnis 0,2 ml EDTA pro 1,0 g Niere resuspendiert.

Um den Anteil der NaK-ATPase an der Gesamtaktivität der ATPase zu erhöhen, wurde das 700 - 1200 g Sediment mit NaJ behandelt. Die NaJ-Lösung bestand aus: NaJ 6 mM/l, Tris 80 mM/l, EDTA 10 mM/l, $MgCl_2$ 5 mM/l, pH 8.5. Die NaJ-Lösung wurde im Verhältnis 1 : 1 mit der Plasmamembran - Suspension vermischt. Nach 10 min wurde die NaJ-Konzentration durch Verdünnen mit 1 mM/l EDTA auf 1,5 mM/l gesenkt und das Gemisch mit 30000 g über eine Zeit von 30 min bei 4°C

---

* Die Zentrifuge war mit einem Drehzahlmesser ausgerüstet, der eine Anzeigegenauigkeit von ± 50 g besaß.

** Pufferzusammensetzung: (1 l H_4 EDTA wurde mit ca. 1,33 ml 3 molarem Tris auf einen pH von 7,5 eingestellt).

zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und verworfen, das Sediment wurde mit 7 ml 1 mM/l EDTA rehomogenisiert und nochmals mit 30 000 g für 15 min zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 0,3 ml 1 mM/l EDTA pro 1 g Niere aufgenommen und bei minus 20°C eingefroren.

Die Gesamtdauer der Präparation betrug ca. 5 Stunden. Die Messung der spezifischen Aktivität der ATPase erfolgte 12 - 24 h später.

3. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der ATPase

Die spezifische Aktivität der ATPase wurde in µMol Pi*/mg Protein · h angegeben. Die ATPase-Reaktion erfolgte in einem Volumen von 500 µl oder 1000 µl bei 37° C. Sie wurden nach 30 min durch Überführen der Proben ins Eisbad und Zugabe von 250 µl oder 500 ul von 15 % Trichloressigsäure beendet. Die gefällten Proteine wurden bei 4° C mit 3000 g über 15 min sedimentiert. In den Überständen wurde Pi bestimmt (s.u.).

Die ATPase-Reaktionen wurden in verschiedenen Ansätzen gemessen (s.Tabelle 1) : Ansatz I entsprach dem Leerwert. Durch seine Messung wurde der nicht-enzymatische Zerfall von ATP in ADP und Pi bestimmt. Da Natrium und Kalium hierauf keinen Einfluß hatten, konnten sie auch weggelassen werden. Der Gehalt des eingesetzten Proteins an Pi konnte wegen der geringen Proteinkonzentration in anbetracht der Höhe der ATPase-Aktivität vernachlässigt werden ($<0,1$ %). Die spezifische Aktivität der Mg-ATPase wurde mit Ansatz II, die der MgNaK-ATPase mit Ansatz III bestimmt. Die spezifische Aktivität der NaK-ATPase wurde rechnerisch durch Subtraktion der MgNaK-ATPase minus Mg-ATPase ermittelt.

---

* Pi = anorganisches Phosphat

Tabelle 1

Darstellung der Reaktionsansätze zur Bestimmung der ATPase-Aktivität

Reagenz	Konzentration	Reaktionsansätze I	II	III
$MgCl_2$	3 mM/l	+	+	+
ATP *	3 mM/l	+	+	+
Imidazol-HCl-Puffer	70 mM/l pH = 7,5	+	+	+
NaCl KCl	100 mM/l 20 mM/l	+	-	+
Enzymprotein **	ca 50 µg Prot./ml	-	+	+

* ATP · Na wurde über Dowex 50 (H^+, 200-400 mesh) entsalzt und mit Imidazol auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Die Konzentration des gelösten ATP wurde im optischen Test mit Hexokinase und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase bestimmt (47).

** Da die ATPase Aktivität nicht linear mit steigender Proteinkonzentration zunimmt, wurde der Reaktionsansatz standardisiert auf eine mittlere Proteinkonzentration von 50 µg/ml.

Phosphat wurde mit der von Fiske und Subbarow (31) entwickelten Methode bestimmt. Im Prinzip handelte es sich dabei um eine photometrische Bestimmung der Konzentration eines durch Reduktion von Phosphormolybdänsäure entstandenen blauen Farbstoffes.
Die drei Lösungen des Reaktionsansatzes zur Phosphatbestimmung setzten sich wie folgt zusammen:
Reagenz I bestand aus 40 ml H_2SO_4 (Konzentration 10 n) und 80 ml $(NH_4)Mo_7O_{24}$ $4H_2O$ (Ammoniumheptamolybdat, Konzentration 2,5 g/v%). Zusätzlich wurden 790 ml aqua bidest zugegeben, so daß ein Gesamtvolumen von 910 ml entstand.
Reagenz II bestand aus 0,5 g 1 - Amino - 2 - naphtol - 4 - sulfonsäure, die in 195 ml $Na_2S_2O_5$ (Konzentration 15 g/v%) und 5 ml Na_2SO_3 (Konzentration 20 g/v%) im Wasserbad bei 60° C unter 10 min Schütteln gelöst wurde.
Eine Phosphat-Eichlösung wurde aus der KH_2PO_4-Stammlösung (Konzentration 1 mg/ml) durch Verdünnung von 0,5 - 5,0 mg/v% = 1 - 10 µg Phosphat/200 µl bereitet.
In dem Reaktionsansatz, bestehend aus einem Gesamtvolumen von 5 ml, befanden sich 0,2 ml Phosphat-Eichlösung oder zu bestimmende Phosphatlösung, 4,6 ml Reagenz I und 0,2 ml Reagenz II.

Nach 30 min wurde die Extinktion des entstandenen Farbstoffes im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm in Duplikaten bestimmt. Es wurden Küvetten verwendet, die je nach Intensität des Farbstoffes eine Schichtdicke von 1-5 cm besaßen. Die Eichkurve war in dem Bereich von 0,5 - 5,0 mg/v% Phosphat linear. Ethacrynsäure, Furosemid und Amilorid hatten bei einer Konzentration von 1 mM/l keinen Einfluß auf die Phosphatbestimmung.

Protein wurde mit einer von Lowry et al. entwickelten Methode bestimmt. Im Prinzip beruht die Methode auf der photometrischen Bestimmung eines blauen Farbstoffes, das durch Reduktion von Phosphormolybdänsäure (aus dem Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteu) durch Tyrosin und Tryptophan entsteht.

Zunächst wurden 2 g/v% $NaCO_3$ in 0,1 n NaOH gelöst, anschließend 0,5 g/v% $CuSO_4$ 5 H_2O in 1 g/v% Kalium-Natrium-Tartrat. Schließlich wurden sie im Verhältnis 50 ml zu 1 ml zum Reagenz III gemischt.

Phenolreagenz nach Folin und Ciocalteus (ca. 2 n von der Fa. Merck) wurde mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein titriert und so verdünnt, daß sie in Bezug auf die Säure 1 n wurde. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln bei 10-15° C.

Protein - Eichlösung wurde aus kristallinem Rinderalbumin durch Verdünnungen von 25-175 mg/v% = 50 - 350 µl/200 ul hergestellt. Im Reaktionsansatz, bestehend aus einem Gesamtvolumen von 240 ul, befanden sich 20 ul Protein-Eichlösung oder zu bestimmendes Protein 200 µl Reagenz III und 20 ul Phenolreagenz.

Nach 30 min. wurde die Extinktion des entstandenen Farbstoffes im Eppendorf-Photometer bei der Wellenlänge von 578 nm in Triplikaten bestimmt. Es wurden Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und einem Gesamtvolumen von 200 ul Verwendet. Die Eichkurve war im Bereich von 25-175 mg/v% linear.

Ethacrynsäure und Amilorid beeinflußten nicht die Proteinbestimmung in einer Konzentration der Diuretica von 10^{-6} - 10^{-7} M/l, die ungefähr der in vivo in der Niere vorkommenden entsprechen könnte.

Materialien:

Sämtliche Chemikalien waren p.a. Reagentien von der Firma E. Merck Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Triphosphopyridinnucleotid, ATP · Na von der Boehringer Mannheim GmbH, Rinderalbumin von der Behringwerke AG, Dowex H^+ von Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Furosemid von der Farbwerke Hoechst AG, Amilorid und Ethacrynsäure von der Deutschen Sharp u. Dohme AG.

4. Versuche zur Wirkung der Diuretica

Die Wirkung der Diuretica auf die ATPase Aktivität der Plasmamembranen wurde sowohl nach in vivo Gabe als auch in vitro untersucht.

A. In vivo Versuche:

Ratten wurden oral mit Hilfe einer Schlundsonde folgende Diuretica verabreicht:

* Furosemid , 100 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 2,5 ml H_2O/100 g Körpergewicht.

** Amilorid , 20 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 1,0 ml H_2O/100 g Körpergewicht.

*** Ethacrynsäure , 50 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 2,5 ml H_2O/100 g Körpergewicht.

Die aufgeführten Diuretika wurden unter Zusatz von Imidazol in Lösung gebracht. Die Kontrolltiere erhielten die entsprechende Menge von Wasser mit Imidazol.
Die Versuche wurden mit Ratten durchgeführt, die an das Schlucken der Schlundsonde und an den Aufenthalt im engen Stoffwechselkäfig gewöhnt waren.

Unmittelbar nach der Gabe der Diuretica wurden die Ratten zur Messung der Salurese in Stoffwechselkäfige gesetzt, in denen Urin und Stuhl getrennt aufgefangen werden konnten. Der Urin wurde in einem Reagenzglas gesammelt, dessen Boden mit einem Öltropfen bedeckt war, um die Verdunstung einzuschränken. Nach einer zweistündigen Sammelperiode wurde die Blase durch manuellen Druck entleert und die Tiere dekapitiert. Anschließend wurden die Plasmamembranen aus dem Homogenat des Nierenpaares präpariert.

Die Urinvolumina wurden gravimetrisch bestimmt. Die Natrium - und

---

* Furosemid = 4 - Chlor - N - (2 - Furfuryl) - 5 - sulfamyl - anthranilsäure. Wir danken der Farbwerke Hoechst AG für die freundliche Überlassung der Substanz Furosemid.

** Amilorid = N - Amidino - 3,5, - diamino - 6 - chloropyrazin - carboxamid. Wir danken Herrn Dr. Hofmann der Deutschen Sharp und Dohme AG für die freundliche Überlassung der Substanzen Amilorid und Ethacrynsäure.

*** Etharynsäure = 2,3 - Dichlor - 4 - (2- methylenbutyryl) phenoxy-essigsäure.

Kaliumkonzentrationen wurden mit dem Eppendorf-Flammenphotometer gemessen. Im Prinzip handelt es sich bei dieser Methode um die Bestimmung der Absorption von monochromatischem Licht durch Natrium- und Kaliumdämpfe. Die verdampften Metalle senden ein typisches diskontinuirliches Spektrum aus. Für die Natriumbestimmung wurde der Absorptionsgipfel bei der Wellenlänge von 589 nm ausgewählt, für die Kaliumbestimmung bei der Wellenlänge von 768 nm. Der Betrag der Absorption ist direkt proportional zur Natrium- und Kaliumkonzentration.

B. In vitro Versuche:

Bei den in vitro Versuchen wurden gepoolte Plasmamembranen von unbehandelten Ratten verwandt. Die Plasmamembranen wurden mit 10^{-3}M/l des jeweiligen Diureticums bei 25° C im ATPase-Reaktionsansatz ohne ATP vorinkubiert. Nach 30 min. wurde die ATPase-Reaktion mit der Zugabe von ATP gestartet. Die Diuretica wurden in 70 mM/l Imidazol (-HVl) Puffer gelöst.

5. Statistische Auswertung

Bei der Ermittlung biologischer Daten, z.B. der spezifischen Aktivität der ATPase, erhält man anstatt eines einzelnen sog. "wahren Wertes" eine gestreute Verteilung von Werten. Um die Lage des unbekannten Wertes μ zu ermitteln, benötigt man eine Schätzgröße und ein Maß für deren Genauigkeit.

Als Schätzgröße diente das arithmetische Mittel $\bar{x}$ der Meßwerte x_n. Das arithmetische Mittel wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i$$

n = Zahl der Werte
i = Ganze Vielfache von 1
x_i = Einzelwert

Als Maß für die durchschnittliche Abweichung der einzelnen Meßwerte von dem Mittelwert gilt die Standardarbweichung s_x*. Sie wurde mit der Formel berechnet:

$$s_x = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x}\sum(x)}{n-1}}$$

Der Mittelwert wurde von einer begrenzten Zahl von Meßwerten (6-13)

* s_x = S.D. = standard deviation

berechnet und unterscheidet sich vom Mittelwert einer anderen Versuchsreihe. Als Maß für die Streuung des Mittelwertes haben wir den mittleren Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ ** bestimmt. Er wurde mit der Formel berechnet:

$$s_{\bar{x}} = \pm \frac{s_x}{\sqrt{n}}$$

Es wurde die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der sich die Mittelwerte der ungepaarten Versuchsgruppen unterschieden. Der Mittelwert $\bar{x}$ der Kontrollratten besaß die Standardabweichung s_x und der Mittelwert $\bar{y}$ der Testratten die Standardabweichung s_y. Die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit alpha erfolgte mit dem t - Test von Student. Es gilt:

$$t_{n_x + n_y - 2} \quad ; \alpha = \frac{(\bar{x} - \bar{y}) - (\mu_x - \mu_y)}{\sqrt{\frac{(n_x - 1)s_x^2 + (n_y - 1)s_y^2}{n_x + n_y - 2}} \sqrt{\frac{n_x \; n_y}{n_x + n_y}}}$$

Es wurde die Nullhypothese angenommen, d.h. $u_x = u_y$, obwohl $\bar{x}$ $\bar{y}$, die Irrtumswahrscheinlichkeit dieser Behauptung wurde mit dem t-Test bestimmt. Der Index der Signifikanz p wurde auf der t-Tafel mit Hilfe der Freiheitsgrade und dem t-Wert abgelesen. Der Unterschied galt als signifikant, wenn $p < 0,05$ war.

** $s_{\bar{x}}$ = S.E. = standard error

II Ergebnisse

1. Einfluß von Diuretica auf die Diurese, Natriurese, Kaliurese und ATPase-Aktivität nach oraler Gabe.

In einer ersten Reihe von Experimenten wurden die Diuretica oral gegeben und die Veränderungen der Diurese, Kaliurese, Natriurese und spezifischen Aktivität der ATPase bestimmt.
Die Tab. 1 zeigt die Zunahme des Urinvolumens und der Elektrolytausscheidung innerhalb zwei Stunden nach oraler Gabe von Furosemid in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht. Das Urinvolumen nahm um das 2,4-fache, die Natriurese um das 40-fache und die Kaliurese um das 4-fache signifikant zu. Wie aus Tab. 1 weiter hervorgeht, waren die MgNaK-ATPase und die NaK-ATPase zwei Stunden nach Verabreichung des Diureticums trotz Salurese unverändert. Es wurde nur eine insignifikante Zunahme der spezifischen Aktivität der Mg-ATPase gefunden.

Eine einzelne Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht Amilorid bewirkte eine deutliche Zunahme der Diurese und Natriurese (Tab.1). Im Unterschied zu Furosemid wurde jedoch eine ausgeprägte antikaliuretische Wirkung beobachtet: die Kaliumausscheidung nahm von 60,7 µVal/100 g Körpergewicht · 2 h auf 22,0 µVal/100 g Körpergewicht · 2 h ab. Gleichzeitig nahmen die spezifischen Aktivitäten der ATPasen um 20-30 % ab. Die Hemmung der MgNaK-ATPase und der NaK-ATPase war signifikant.
Die prozentuale Hemmung der ATPasen war stärker und betrug 30-40 %, wenn die Ratten chronisch über 5-8 Tage mit der gleichen Einzeldosis behandelt wurden. In diesem Fall waren alle drei ATPase-Aktivitäten signifikant vermindert (Tab.1).

Ethacrynsäure hatte bei einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von zwei Stunden keine diuretische Wirkung (Abb.1). Die spezifische Aktivität der Mg-ATPase stieg jedoch signifikant um 93 %. Die Aktivität der MgNaK-ATPase stieg nicht signifikant um 38 %. Die rechnerisch ermittelte Aktivität der NaK-ATPase veränderte sich nur gering.

2. Einfluß von Diuretica auf die ATPase-Aktivität unter in vitro Bedingungen.

In einer anderen Reihe von Experimenten wurde der Einfluß von 10^{-3} M/l Diuretica auf die ATPase-Aktivität in vitro untersucht.

Wie aus Tab.2 hervorgeht, hatte Furosemid keinen Einfluß auf die MgNaK-ATPase und die NaK-ATPase. Die Mg-ATPase wurde leicht stimuliert.

Amilorid hemmte dagegen alle drei ATPase-Aktivitäten signifikant (Tab. 2).

Ethacrynsäure hemmte im Unterschied zu Amilorid und Furosemid die spezifische Aktivität der MgNaK-ATPase und der NaK-ATPase (Tab.2).

3. Einfluß der Diuretica auf die Kinetik der ATPase-Reaktionen.

Die hemmende Wirkung von Amilorid und Ethacrynsäure auf die ATPase Reaktionen wurde in Versuchen zur Enzymkinetik mit Hilfe der Lineweaver Burk-Gleichung analysiert. Die Aktivität der MgNaK-ATPase wurde bei verschiedenen Konzentrationen von Mg · ATP, Natrium und Kalium mit und ohne Anwesenheit des Diureticums (10^{-3} M/l) gemessen.

Wie aus der Abb.1 und der Tab.3 hervorgeht, senkte Amilorid bei Mg · ATP und Natrium als "Substrat" die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante. Amilorid hemmte daher nach einem unkompetitiven Hemmungstyp. Bei Kalium als "Substrat" hingegen blieb die maximale Reaktionsgeschwindigkeit unverändert, während die Michaelis-Menten-Konstante zunahm. Amilorid hemmte also die Kalium-Aktivierung kompetitiv.

Ethacrynsäure wirkte auf die Aktivierung des Enzyms durch Mg · ATP und Natrium unkompetitiv hemmend: die Maximalgeschwindigkeit V_{max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_m nahmen ab (Abb. 1 und Tab. 4). Der Einfluß auf die Kalium-Aktivierung bestand im Unterschied zu

Amilorid in einer nicht-kompetitiven Hemmung, denn die Maximal-geschwindigkeit war vermindert und die Michaelis-Menten Konstante blieb gleich.

D. Diskussion

I. Diskussion der Methoden

1) Gewinnung und Identifikation subzellulärer Strukturen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der NaK-ATPase untersucht, die an Plasmamembranen gebunden ist. Die von uns gewonnene subzelluläre Fraktion wurde von Ebel et al. (21) elektronenmikroskopisch und biochemisch identifiziert.

Die Schwierigkeit reine Präparationen bestimmter subzellulärer Strukturen zu gewinnen, liegt darin, daß "verunreinigende" Membranvesikel gleicher Größe und Dichte und anderer Lokalisation durch Differential - und Dichtegradientenzentrifugation schwer abgetrennt werden können. So sind z.B. aus der Niere gewonnene Mikrosomen mit Bruchstücken von Plasmamembranen verunreinigt (13). Weitergehende Versuche, mit chemischen Methoden eine größere Fraktionsreinheit zu erreichen , sind dadurch erschwert, daß die Ausbeute der gewünschten Fraktion stark absinkt. Außerdem kann dabei die ursprüngliche Membranstruktur verändert werden (46). Die von uns verwendete NaJ-Methode , bei der das Plasmamembranen und Mitochondrien enthaltende 700-1200 g Sediment extrahiert wird, entfernt zwar die mitochondriale Beimengung und löst wahrscheinlich auch einen Teil der Plasmamembranen. Dabei zerstört es aber die Membranstruktur, die sich im Elektronenmikroskop nur noch als amorphe granuläre Fraktion darstellt. Die erzielte Anreicherung der NaK-ATPase als Leitenzym für Plasmamembranen war daher mit einer geringen Ausbeute verbunden, nämlich 1% der gesamten cellulären MgNaK-ATPase-Aktivität. (21).

Die Reinheit der präparierten Plasmamembranen wird im Prinzip mit verschiedenen Methoden bestimmt, und zwar durch morphologische Untersuchungen mit Hilfe des Elektronenmikroskopes, durch biochemische Untersuchungen an Hand von Leitenzymen oder Leitsubstanzen und durch immunologische Untersuchungen mit der Immunodiffusion und Immunelektrophorese, sowie Immunfluoreszenzmikroskopie. Die elektronenmikroskopische Charakterisierung von isolierten Membranfraktionen ist bei der Überprüfung ihrer Reinheit unerläßlich. Allerdings wird die Identifikation von

glatten Membranstücken dadurch eingeschränkt, daß z.B. glattes endoplasmatisches Retikulum und abgesprengte äußere Mitochondrienmembranen nicht sicher von Plasmamembranen unterschieden werden können (29). Nur wenn besondere Merkmale, wie z.B. anhaftende Gallengangskanälchen bei Untersuchungen an der Leber oder "tight junctions" sichtbar sind, kann man die Plasmamembranen sicher identifizieren. Die Aussagekraft der Elektronenmikroskopie wird weiterhin durch das Auflösungsvermögen eingeschränkt, das gegenwärtig nicht bis in den molekularen Bereich hinabreicht.
Die elektronenmikroskopische Charakterisierung der gewonnenen membranhaltigen Fraktion wird durch biochemische Untersuchungen erweitert. Mit Hilfe von Leitenzymen und Leitsubstanzen versucht man, zwischen den verschiedenen Membranen zu unterscheiden. Einmal wird es damit möglich, lösliche cytoplasmatische Enzyme, die an die Membranen absorbiert sind, zu identifizieren. Zum anderen können auch morphologisch nicht weiter differenzierbare glatte Membranen erkannt werden, z.B. Mitochondrienmembranen mit Hilfe der Succinodehydrogenase und Monoaminooxydase, endoplasmatisches Retikulum mit Hilfe der Glucose-6-Phosphatase und NADH-Cytochrom Reduktase (35) etc.

Allerdings setzt diese Methode stabile Leitenzyme voraus, die nur in einem bestimmten Zellteil lokalisiert sind und die Reinigung der jeweiligen Fraktion ohne Aktivitätsänderungen überstehen. Die bisher als mikrosomales Enzym geltende Glucose-6-Phosphatase, konnte auch in Plasmamembranen nachgewiesen werden (21, 24, 25, 44). Emmelot und Bos (26) fanden nach Behandlung mit Desoxycholat, daß die Glucose-6-Phosphatase der Plasmamembranen andere Eigenschaften als das mikrosomale Enzym besitzt und folgerten, daß die Glukose-6-Phosphatase ein Enzym der Plasmamembranen ist. Hierdurch wird deutlich, wie schwierig es ist, spezifische Leitenzyme für nur eine subzelluläre Fraktion zu finden.

Die biochemische Charakterisierung der jeweiligen isolierten Membranfraktion wird ergänzt durch immunologische Methoden. Nach der Gewinnung und Reinigung von Antikörpern gegen die zu charakterisierende Membranfraktion wird mit Hilfe der Immunodiffusion, Immunelektrophorese und

Immunfluoreszenz versucht, die Reinheit der Fraktion zu prüfen (25, 58, 61). So konnte z.B. Neville (58) die Reinheit einer Plasmamembranfraktion der Leber belegen. Der hergestellte Plasmamembran-Antikörper präzipitierte nur Plasmamembranen, nicht aber Nuklei, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Jedoch kann die Aussagekraft der immunologischen Methoden durch das Problem der "cross reactivity" eingeschränkt werden, die z.B. zwischen Plasmamembranen und Mikrosomen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen beobachtet wurde (75). Weiterhin wird die Interpretation dieser Untersuchungen dadurch erschwert, daß in der Regel mit nicht gelösten, partikulären Antigenen gearbeitet wurde, die schlechte Diffusionsfähigkeit in Agarose besitzen. Die vollständige Lösung von Membranen und die anschließende Charakterisierung einzelner Proteinkomponenten ist aber bis heute unvollkommen und schwierig (42).

2) Die Präparation von Plasmamembranen

Die Methoden zur Gewinnung von Plasmamembranen aus parenchymatösen Organen wurden an der Leber zuerst von Neville (57), später von Emmelot und Bos (24) entwickelt, Im Prinzip handelt es sich um die Gewinnung eines 1000-1500 g Sedimentes, das neben Plasmamembranen noch Zellkern, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und unaufgeschlossene Zellen enthält. Mit einer anschließenden Dichtegradientenzentrifugation wurden die Plasmamembranen angereichert und gereinigt. Aufbauend auf den Erfahrungen von Emmelot und Bos an den Leberplasmamembranen haben Kinsolving et al. (45), später auch Ebel et al. (21), so wie Fitzpatrick et al. (32) und Kinne et al. (44) aus Nierenhomogenaten Plasmamembranen isoliert .

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Ebel et al. (21) entwickelte Methode zur Präparation von Plasmamembranen aus der Niere verwendet. Ähnlich wie bei Emmelot und Bos angegeben wurde, daß zuvor mit einer Schere zerkleinerte Nierenpaar schonend mit einem Potter-Elvehjem-Gerät homogenisiert. Im Unterschied zu Emmelot und Bos und auch Kinsolving verwendeten wir ein isotones Homogenisationsmedium, dem EDTA zugefügt war. Die hypotone Homogenisation führt nämlich zu einem Abplatzen der Zellkernmembranen und der äußeren Mitochondrienmembranen

die elektronenmikroskopisch später schwer von den glatten Plasmamembranen unterschieden werden können. Das EDTA wirkte dem Verkleben von Mitochondrien und Plasmamembranen in sucrosehaltigen Medien, wie es Neville (57) beobachtete, entgegen. Außerdem umgingen wir anders als Emmelot und Bos (24) das Problem der Anwesenheit von Zellkernen in der Plasmamembranfraktion. Die Kerne wurden zuvor mit mehrmaliger Zentrifugation bei 700 g abgetrennt und waren im Phasenkontrastmikroskop morphologisch intakt. Der pH-Wert des Homogenisationsmediums lag bei 7,9, da im alkalischen Bereich weniger Proteine des Cytoplasmas an die Plasmamembranen absorbiert werden (41). Nach der Abtrennung der Zellkerne und dem Sedimentieren der plasmamembranreichen Fraktion wurde durch mehrfaches hypotones Waschen in 1 mM/l EDTA-Lösung Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum entfernt. Anschließend wurde das 700-1200 g Sediment unter Verzicht auf die herkömmlicherweise benutzte Dichtegradientenzentrifugation mit NaJ extrahiert. Ohne NaJ Extraktion, aber mit Dichtegradientenzentrifugation erhielten Coleman und Finean (12) eine Verunreinigung der Plasmamembranen aus Nierenrinde mit 15-30 % an Mitochondrien und Mikrosomen. Die von uns verwandte NaJ Extraktion, welche neben der Anreicherung von NaK-ATPase (s.u.) auch zu einer Auflösung der Mitochondrien führt (21), besitzt den Vorteil, schneller und besser reproduzierbar zu sein. Der Gehalt an endoplasmatischem Retikulum dieser NaJ behandelten Plasmamembranen betrug, gemessen an der Glucose-6-phosphatase-Aktivität, ca. 12 % (21). Es ist damit vergleichbar mit den Ergebnissen von Coleman und Finean (12) nach Dichtegradientenzentrifugation. Allerdings ist die Verwendung der Glucose-6-Phosphatase als mikrosomales Leitenzym nach Emmelot und Bos (26) deshalb problematisch, weil sie offensichtlich andere Eigenschaften als das mikrosomale Enzym besitzt, d.h. plasmamembrantypisch in der Leber sein kann. Spätere Ergebnisse von Ebel et al. (21) mit Dichtegradientenzentrifugation des 700-1200 g Sedimentes aus der Rattenniere ergaben mit einem Anteil von 50 % NaK-ATPase an der Gesamt-ATPase-Aktivität eher niedrigere Anreicherungen von NaK-ATPase als die NaJ-Methode. Der Anteil der mikrosomalen Glukose-6-Phosphatase war etwa ebenso groß wie bei den NaJ extrahierten Plasmamembranen, während der Anteil an mitochondrialer Succinodehydrogenase höher war. Zusammenfassend ergibt sich, daß die NaJ extrahierten Plasmamembranen eine einfach

und schnell gewinnbare Fraktion mit befriedigendem Reinheitsgrad darstellen.

3) Methoden zur Aktivitätssteigerung der NaK-ATPase

Ziel der Präparationstechnik war es , in den gewonnenen Plasmamembranen eine ATP-Aktivität mit möglichst hohem Anteil der NaK-ATPase zu erhalten, denn im Homogenat und im 700-1200 g Sediment war die prozentuale NaK-ATPase Aktivität mit ca 10% gering (21). Diese Beobachtung wurde nicht nur an Nierenplasmamembranen (21,32,44,45), sondern auch an Leberplasmamembranen (12,24,25) gemacht. Zur Anreicherung der NaK-ATPase stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Landon und Norris (48), sowie Ebel et al. (21) untersuchten den Einfluß der Dialyse auf mikrosomal- bzw. plasmamembrangebundene NaK-ATPase aus der Rattenniere. Es ergab sich nur ein geringer Zuwachs an NaK-ATPase-Aktivität, die zudem besonders bei Landon und Norris (48) schwer reproduzierbar war.

Der Dialyse überlegen erwies sich die Behandlung der ATPase enthaltenden Membranen mit Detergentien, wie z.B. Natriumdesoxycholat (DOC). Emmelot und Bos (24) erhielten an Plasmamembranen der Leber einen Aktivitätsanstieg der NaK-ATPase um 30-40 %. In den Nierenplasmamembranen von Ratten ergab jedoch die DOC Behandlung im Unterschied zu Mikrosomen aus Kaninchennieren keine besseren Resultate als die Dialyse (21). Unsere Plasmamembranen wurden mit NaJ extrahiert. Die Technik war eine Modifikation der von Nakao (54) und Matsui (52) beschriebenen Methode. Im Unterschied zu den genannten Autoren, die 2 molares NaJ an Erythrocyten bzw. Herzmuskel verwendeten, erhielten Ebel et al (21) an der Nierenplasmamembran mit 3 molarem NaJ bessere Ergebnisse, nämlich einen mittleren Quotienten (MgNaK-ATPase/Mg-ATPase) von 6.0 d.h., daß ca. 80 % des Enzyms durch Natrium und Kalium aktivierbar waren. Die Ursache der Aktivitätssteigerung nach der der NaJ-Behandlung liegt nach Fitzpatrick et al. (32) unter anderem in der Herauslösung von niedermolekularen Proteinen, die keine ATPase-Aktivität enthalten. Die durch Differentialzentrifugation gewonnene und mit NaJ behandelte plasmamembranale ATPase wurde auf ihr pH-Optimu, Substratspezifität, Mg-Na-K-Stimulierbarkeit und Strophantin g-Hemmbarkeit

untersucht (21). Es ergab sich, daß diese plasmamembranale NaK-ATPase den allgemein anerkannten Charakteristica der mikrosomalen NaK-ATPase entsprach.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die spezifische Aktivität dieses Enzyms mit verschiedenen Größen der Natriurese und Kaliurese zu korrelieren. Hierbei muß in Betracht gezogen werden, daß insbesondere die NaJ-Extraktion und auch das Herausbrechen der Membranpartikel zu Veränderungen der Membraneigenschaften und Enzymcharakteristica führen können, z.B. durch Verlust eines "modifiers" oder durch die Kehrung der Membraninnenseite nach außen. Lengsfeld und Hasselbach wiesen mit Hilfe von Hg-Phenyl-Azuferritin nach, daß dieses SH-Reagenz an isolierten Plasmamembranenvesikeln stets nur auf der Außenseite gebunden wird, während es unter in vivo Bedingungen nur auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembranen gefunden wurde (49). Dies kann dahingehend interpretiert werden, daß in vitro die cytoplasmatische Membranseite nach außen gekehrt ist. Die von uns verwendete NaJ Extraktion führt jedoch zu einer Auflösung der Membranvesikel, so daß diese nicht länger als Diffusionshindernis für den Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum der NaK-ATPase wirksam ist.

Läßt man Pharmaka nach oraler Gabe oder im in vitro Versuch auf die so gewonnene ATPase einwirken, dann müssen weitere Einschränkungen der Aussagekraft dieser Versuche berücksichtigt werden. Die in vivo möglichen reversiblen Aktivitätsänderungen durch Variation der Natrium- und Kaliumkonzentration des pH-Wertes etc. können mit einer in vitro Messung unter optimalen Bedingungen nicht zum Ausdruck kommen. In vitro können nur Konzentrations- oder Konfigurationsänderungen und eine irreversible Bindung des Pharmakons erfaßt werden.

Weiterhin ist möglich, daß der Isolierungsprozeß das Enzym so verändert, daß es in vitro anders als in vivo auf das Pharmakon reagiert. Es ist ebenfalls denkbar, daß das Pharmakon in vivo nicht zu dem Enzym gelangt bzw. nicht genügend am Enzym konzentriert oder aber metabolisch verändert wird.

Schließlich wird das Pharmakon, sofern es sich nicht um eine irreversible Bindung handelt, bei der Plasmamembranpräparation und NaJ Extraktion ausgewaschen. Aus diesen Gründen sind in vitro Untersuchungen unentbehrlich. Hier jedoch ergeben sich folgende Schwierigkeiten: Das Enzym kann durch den Isolierungsprozeß derart verändert sein, daß es in vitro nicht mehr durch das Pharmakon hemmbar ist, oder aber anders als in vivo gehemmt wird. Das Pharmakon ist meist an dem Wirkungsort stärker konzentriert als unter in vivo Bedingungen. So wird verständlich, wie problematisch die Übertragung der in vitro gewonnenen Ergebnisse auf die in vivo Bedingungen ist.

II. Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Urinausscheidung nach Gabe von Furosemid, Amilorid und Ehtacrynsäure untersucht. Furosemid wirkte ebenso wie bei Hook und Williamson (39) stark natriuretisch und Amilorid schwach natriuretisch und kaliumsparend. Ethacrynsäure zeigte bei unseren Versuchen in einer Dosis von 50 mg/kg wie bei Beyer et al. (7) und Schultz et al. (65) keinen Einfluß auf die renale Natrium- und Wasserausscheidung. Zins et al. (80) hatten nach intravenöser Ethacrynsäureinfusion und Volumenexpansion eine kurzzeitige Natriurese bei der Ratte ausgelöst.

Entsprechend dem bevorzugten Angriffsort hemmen Furosemid und Ethacrynsäure vor allem in dem aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife die Natriumreabsorption. Amilorid soll im zweiten Teil des distalen Konvolutes und in den Sammelrohren angreifen (37). Der Wirkungsmechanismus der Diuretica ist noch nicht im einzelnen geklärt. Nierenphysiologische Untersuchungen (3,5,7,15,16,17,22,23,74) ergaben Hinweise, daß Diuretica mit dem aktiven Natriumtransport interferieren. Auch eine Beeinflussung der Ionenpermeabilität der Tubulusmembranen durch Diuretica wurde diskutiert. Da der aktive Ionentransport durch Zellmembranen von der Aktivität der NaK-ATPase abhängig sein soll (67), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob in der Niere nach Gabe von Diuretica eine Beziehung zwischen der aktiven Natriumreabsorption und der plasmamembrangebundenen NaK-ATPase Aktivität besteht. Frühere Untersuchungen ergaben, daß Quecksilberdiuretica die mikrosomale NaK-ATPase der Niere hemmen (9,40, 73, 76, 79).

Außerdem wurde beobachtet, daß nach intravenöser Infusion von Strophantin g bei Küken gleichzeitig eine Natriurese und eine Hemmung der NaK-ATPase (59) auftrat. Es blieb allerdings offen, ob die Korrelation zwischen Natriurese und mikrosomaler NaK-ATPase auch für die plasmamembranale NaK-ATPase besteht.

Wie wir fanden, bewirkte Furosemid, ebenso wie von Hook und Williamson (39) berichtet, eine starke Natriurese. Die spezifische Aktivität der NaK-ATPase wurde aber weder nach oraler Gabe, noch nach Zusatz des Diureticums zum in vitro Enzymtest verändert. Der abweichende Befund von Hook und Williamson (39), die eine Hemmung der mikrosomalen NaK-ATPase 3 Stunden nach in vivo Gabe von 50 mg/kg Furosemid fanden, ist möglicherweise auf ein unterschiedliches Verhalten der an Plasmamembranen und Mikrosomen gebundenen ATPase zurückzuführen oder aber dem unterschiedlichen Reinheitsgrad der NaK-ATPase enthaltenen Membranfraktionen zuzuschreiben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß sich die Aktivität der membrangebundenen NaK-ATPase nach Gabe von Furosemid nur in einem bestimmten Nephronabschnitt ändert, was bei der Messung der Enzymaktivität in der gesamten Niere nicht zum Ausdruck kommt. Schmidt und Dubach (64) gelang es, nachzuweisen, daß 100 mg/kg Furosemid nach 2 Stunden nur am distalen Tubulus und dem aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife die ATPase hemmt. An diesen Befunden bleibt die Frage offen, warum nicht auch die NaK-ATPase des proximalen Tubulus gehemmt wird, denn aus Mikropunktionsuntersuchungen geht hervor, daß Furosemid auch die proximale tubuläre Natriumreabsorption hemmt. Diese fehlende Übereinstimmung zwischen NaK-ATPase-Aktivität und Ort der Natriurese ist unter Umständen dosisabhängig. Sie kann aber auch dadurch bedingt sein, daß Schmidt und Dubach im Homogenat der mikrodissezierten Tubuluszellen, nicht aber in verschiedenen subzellulären Fraktionen die ATPase Aktivitäten gemessen haben. Außerdem bezogen wir die ATPase-Aktivität auf die Proteinkonzentration, während Schmidt und Dubach die Enzymaktivität auf Trockengewicht bezogen. Zusammengefaßt ist es gegenwärtig nicht möglich, eine eindeutige Korrelation zwischen NaK-ATPase-Aktivität und dem tubulären Angriffsort von Furosemid herzustellen.

Im Unterschied zu Furosemid bewirkte das schwache Natriureticum und Antikaliureticum Amilorid eine Hemmung der NaK-ATPase. Dieser Effekt wurde sowohl nach oraler Gabe als auch bei in vitro Versuchen beobachtet. Es steht im Gegensatz zu der von Duggan (20) berichteten unveränderten Aktivität der NaK-ATPase bei in vitro Gabe von $5 \cdot 10^{-4}$ M/l. Nach der Vorstellung von Bentley (5) hemmt Amilorid die Permeabilität von Natrium auf der mucosalen Seite der isolierten Krötenblase, was der kapillären Seite mit den Basal-Lateralmembranen der Nierenzellen entspricht. Die gleichzeitige Hemmung der plasmamembranalen NaK-ATPase ist überraschend, da sich für eine Funktion dieses Enzyms bei der Kontrolle der Permeabilität bisher keine Hinweise bestehen. Wahrscheinlicher ist es, daß die Hemmung der NaK-ATPase auf einem Effekt beruht, der nicht direkt mit der Natriurese in Zusammenhang steht, sondern von dem noch unbekannten physikalisch-chemischen Mechanismus beeinflußt wird, der die Permeabilitätsveränderung auslöst.

Die Korrelierbarkeit von NaK-ATPase-Aktivität und Natriurese wird durch die Befunde mit Ethacrynsäure ebenfalls in Frage gestellt. Ethacrynsäure ist zwar unter besonderen Umständen bei intravenöser Gabe und gleichzeitiger Volumenexpansion bei der Ratte ein kurzfristig und schwach wirkendes Diureticum (80), aber nach oraler Gabe ist es nicht als Diureticum wirksam. Nach oraler Gabe von 50 mg/kg Ethacrynsäure beobachteten wir nach 2 Stunden eine Stimulation der Mg-ATPase. Dieser Befund steht im Gegensatz zu dem von Hook und Williamson (39) die drei Stunden nach Gabe von 25 mg/kg Ethacrynsäure eine Hemmung der mikrosomalen NaK-ATPase fanden. Nun muß aber betont werden, daß auch nach Adrenalektomie ein unterschiedliches Verhalten von mikrosomaler und plasmamembranaler ATPase gefunden wurde. Während die mikrosomale NaK-ATPase abnahm (41a), stieg die Mg-ATPase und die NaK-ATPase der Plasmamembranen an (63). Wir vermuten deshalb, daß die aus Plasmamembranen gewonnene NaK-ATPase ein von der mikrosomalen NaK-ATPase unterschiedliches Verhalten aufweist.

Unter in vitro Bedingungen erhielten wir im Unterschied zu den in vivo Befunden eine Hemmung der Plasmamembranalen ATPase. Entsprechende Befunde wurden von Duggan und Noll (18,19), Nechay und Palmer (55), Charnock et al. (10), Davis (14) und Banerjee und Sen (4) erhoben.

Diese in vitro Hemmung der NaK-ATPase in Plasmamembranen der Rattenniere sprach gegen eine Korrelation der diuretischen Wirkung mit der ATPase, da gleichzeitig keine Natriurese bestand. Allerdings ist der Versuch, einen in vivo Zustand (Natriurese) mit später in vitro gemessenen Enzymaktivitäten zu vergleichen, problematisch.

Die Schwierigkeit, eine Korrelation zwischen aktivem Natriumtransport und NaK-ATPase-Aktivität aufzustellen, wird nicht nur bei dem Vergleich von in vivo und in vitro Versuchen klar, sondern auch durch die an verschiedenen Nierenmembranen und Species erhobenen Befunde dargestellt: Für eine Korrelation der bei einigen Spezies ausgelösten Ethacrynsäure - Diurese mit der ATPase-Aktivität sprechen folgende Befunde:

1) Duggan und Noll (18) fanden bei den Versuchen mit verschiedenen Ethacrynsäure-Analoge eine positive Korrelation ihres Hemmungsgrades der NaK-ATPase und des diuretischen Effektes beim Hund.
2) Eine zweite positive Korrelation stellt der Befund dar, daß Ethacrynsäure in vitro die NaK-ATPase pH-unabhängig hemmte und daß in vivo die Diurese nicht durch Änderung des Säure-Basen-Haushaltes veränderbar war (Mudge (53)) und(Beyer et al. (7)).

Eine Reihe von Beobachtungen sprechen aber gegen eine Erklärung der diuretischen Wirkung der Ethacrynsäure durch eine Hemmung der NaK-ATPase:

1) Nechay und Palmer (55) stellten fest, daß Ethacrynsäure zur Zeit der maximalen Diurese in den Mikrosomen in einer 1000 mal kleineren Konzentration vorliegt, als es für eine 50 %ige Hemmung der mikrosomalen NaK-ATPase in vitro erforderlich war.
2) Hook und Williamson (39) beschrieben, daß Ethacrynsäure nach in vivo Gabe zwar die NaK-ATPase einer mikrosomalen Fraktion der Rattenniere hemmte, aber keine Diurese bestand.

3) Andererseits konnte der hemmende Einfluß von Ethacrynsäure auf die Erythrocytenschatten ATPase durch Auswaschen beseitigt werden, ohne daß danach der aktive Kationentransport wiederhergestellt wurde (Smith et al. (72)).

Zusammengefaßt muß gesagt werden, daß an den Mikrosomen von verschiedenen Autoren (39, 55) keine eindeutige Korrelation der natriuretischen Wirkung der Diuretica mit ihrem Einfluß auf die NaK-ATPase aufgestellt werden konnte. Unsere Befunde an Plasmamembranen der Rattenniere können einen direkten Einfluß von Diuretica auf die NaK-ATPase nicht ausschließen. Sie zeigen aber, daß die Veränderung der NaK-ATPase Aktivität zur Erklärung der diuretischen Wirkung dieser Substanzen nicht ausreicht. Daraus kann folgen, daß entweder die Methode der Enzymanalyse an Membranen in der bestehenden Form nicht für die Erforschung der Korrelierbarkeit von NaK-ATPase und aktiven Na-Transport geeignet ist, oder daß eine ausschließliche Korrelation von NaK-ATPase und aktiver Natriumrückresorption in den Nierentubuli nicht besteht. Letzteres würde bedeuten, daß die NaK-ATPase nur einen Teil des Ionentransportsystems darstellt oder das noch ein zweiter, ATPase unabhängiger Mechanismus daran beteiligt ist. Es gibt Hinweise, daß Ethacrynsäure nicht nur an Nierenschnitten (Whittembury (78)), sondern auch an Erythrocyten (Hoffman (38)) den Strophantin g unempfindlichen und ATP unabhängigen Teil des Natrium-Transportes hemmt (Pumpe II).

E. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Diuretica auf die spezifische Aktivität der renalen, an Plasmamembranen gebundenen NaK-ATPase unter in vivo und in vitro Bedingungen untersucht und mit der Diurese, Natriurese und Kaliurese verglichen.

Das starke Salureticum Furosemid hatte weder in vivo noch in vitro einen Einfluß auf die NaK-ATPase-Aktivität. Amilorid, ein kaliumsparendes Diureticum mit schwach natriuretischer Wirkung, hemmte in vivo und in vitro die NaK-ATPase. In den in vitro Versuchen wurde festgestellt, daß Amilorid die Kaliumaktivierung der NaK-ATPase kompetitiv hemmte. Amilorid hemmte außerdem auch die Mg-ATPase.

Ethacrynsäure wirkte in unseren Versuchen nicht diuretisch. Sie steigerte nach in vivo Gabe die NaK-ATPase-Aktivität geringfügig und senkte diese in vitro. In vitro wurde die Kaliumaktivierung der NaK-ATPase nicht kompetitiv gehemmt.

Aus den Befunden geht hervor, daß zwischen der in vitro gemessenen NaK-ATPase-Aktivität und der Natriurese in vivo keine eindeutige Korrelation besteht. Es muß daher angenommen werden, daß ein Teil der gesamten renalen Natriumreabsorption von der NaK-ATPase und von ATP als Energiequelle unabhängig ist.

Literatur

1. Albers, R.W.: Biochemical aspects of active transport. Ann.Rev.Biochem 36:727 (1967).

2. Bader, H., A.K. Sen: (K^+)-dependent acyl phosphatase as part of the (Na^+ + K^+)-dependent ATPase of cell membranes. Biochim. Biophys.Acta 118:116 (1966).

3. Baer, J.E., C.B. Jones, S.A. Spitzer, H.F. Russo: The potassium-sparing and natriuretic activity of amipramizide. J.Pharm.exp. Ther. 146:23 (1967).

4. Banerjee, S.P., V.K. Khanna, A.K. Sen: Inhibition of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase by ethacrynic acid: Ligand-induced modification. Biochem.Pharmacol. 20:1649 (1971).

5. Bentley, P.J.: Amiloride, a potent inhibitor of sodium-transport across the toad bladder. J.Physiol. (Lond.) 195:317 (1969).

6. Berg, G.G., B. Chapman: (K^+) dependent acyl phosphatase as part of the (Na^+ + K^+) dependent ATPase of cell membranes. Biochim. Biophys.Acta 118:116 (1966).

7. Beyer, K.H., J.E. Baer, I.K. Michaelson, H.F. Russo: Renotropic characteristics of ethacrynic acid: a phenoxyacetic saliuretic-diuretic agent. J.Pharm.exp.Ther. 147:1 (1965).

8. Blomberg, F., P. Perlmann :Immunochemical studies of detergent-soluble nucleoside phosphotases in rat liver plasma membranes. Biochim.Biophys.Acta 233:53 (1971).

9. Bowman, F.J., E.J. Landon: Organic mercurials and potassium in rat kidney slices. Am.J.Physiol. 213:1209 (1967).

10. Charnock, J.S., H.A. Potter, D. McKee: Ethacrynic acid inhibition of (Na^+ + K^+)-activated adenosinetriphosphatase. Biochem.Pharm. 19:1983 (1970).

11. Chignell, C.F., E. Titus: Effect of adrenal steroids on a Na^+- and K^+-requiring adenosine triphosphatase from rat kidney. J.Biol.Chem 241:5083 (1966).

12. Coleman, R., R.H. Michell, J.B. Finean, J.N. Hawthorne: A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions. Biochim.Biophys.Acta 135:573 (1967).

13. Dallner, G. und L. Ernster: Subfractionation and composition of microsomal membranes: a review. J.Histochem.Cytochem. 16:611 (1968).

14. Davis, P.W.: Inhibition of renal Na-K-activated ATPase-activity by ethacrynic acid. Biochem.Pharm. 19:1983 (1970).

15. Deetjen, P.: Mikropunktionsuntersuchungen zur Wirkung von Furosemid. Pflüg. Arch. ges. Physiol. 284:184 (1965).

16. Deetjen, P., W.E. Büntig, R. Hardt, R. Rohde: Diuretic effect of ethacrynic acid in the rat: a micropuncture study concerning the relationship of the site and mode of diuretic action. Prog. in Nephrology. G. Peters (Ed.), Springer, Heidelberg 1969.

17. Duarte, G.D., F. Chomety and G. Giebisch: Effect of amiloride, ouabain and furosemide on distal tubular function in the rat. Am. J. Physiol. 221:632 (1971).

18. Duggan, D.E., R.M. Noll: Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosinetriphosphatase of renal cortex. Arch. Biochem. Biophys. 109:388 (1965).

19. Duggan, D.E., R.M. Noll: A biochemical basis for the inactivity of ethacrynic acid in the rat. Biochim. Biophys. Acta 121:162 (1966).

20. Duggan, De.E.: Persönliche Mitteilung. Zitiert in Baer et al. (1967).

21. Ebel, H., N.G. De Santo, K. Hierholzer: Plasma cell membranes of the rat kidney. I. Properties and purification of cell membrane ATPase. Pflüg. Arch. ges. Physiol. 324:1 (1971).

22. Ehrlich, E.N., J. Crabbé: The mechanism of action of amipramizide. Pflüg. Arch. ges. Physiol. 302:79 (1968).

23. Eigler, J.E., N. Carl, H.H. Edel: Der Einfluß von Ethacrynsäure auf Membranpotential und Kurzschlußstrom an der Krötenhaut. Klin. Wschr 44:417 (1966).

24. Emmelot, P., C.J. Bos, E.L. Benedetti, P. Rümke: Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta (Amst. 90:126 (1964).

25. Emmelot, P., J. Bos: III. Mg^{2+} ATPase, Na^{+}-K^{+}-Mg^{++}-ATPase and 5-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta (amst.) 120:369 (1966).

26. Emmelot, P., C.J. Bos: Studies on plasma membranes. XI. Inorganic pyrophosphotransferase and glucose-6-phosphatase in plasma membranes and microsomes isolated from rat and mouse livers and hepetomas.

27. Epstein, F.: The role of Na-K-ATPase in the reabsorption of sodium renal transport and diuretics. International Symp. Feldafing 1968.

28. Epstein, F.H., I.A. Katz, G.G. Pickford: Sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of gills: role in adaption of Teleorts to salt water. Science 156:1245 (1967).

29. Enzyme Cytology. Ed. Rordyn, D.B. Academic Press, London 1967.

30. Ernst, S.A., C.C. Goertemiller, jr, R.A. Ellis: The effect of salt regimens in the development of (Na^+ - K^+)-dependent ATPase activity during the growth of salt glands of ducklings.

31. Fiske, O.H., Y. Subbarow: The coloremetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66:375 (1925).

32. Fitzpatrick, D.F., G.R. Davenport, L.R. Forte, E.J. Landon: Characterization of plasma membrane proteins in mammalian kidney. I. Preparation of a membrane fraction and separation of the protein. J. Biol. Chem. 244:3561 (1969).

33. Folin, O. V. Ciocalteu: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J. Biol. Chem. 73:627 (1927).

34. Glynn, I.M.: The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells. J. Physiol. 136:148 (1957).

35. Handbook of Biochemstry. Ed. M.A. Sober. The chemical rubber Co. Cleveland 1968.

36. Heinz, E.: Transport through biological membranes. Ann. Rev. Physiol. 29:211 (1967).

37. Hierholzer, K., P. Froese: Optimale Therapie der Diuretica. Deutsches Med. Journal. 23 (2):85 (1972).

38. Hoffman, J.F., D.C. Tosteson und R. Whittam: Retention of potassium erythrocyte ghosts. Nature 185:186 (1960).

39. Hook, J.B., H.E. Williamson: Lack of correlation between natriuretic activity and inhibition of renal Na-K-activated ATPase. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 120:358 (1965).

40. Jones, V.D., J.G. Lockett, E.J. Landon: A cellular action of mercurial diuretics. J. Pharmacol. exp. Ther. 147:23 (1965).

41. Jørgensen, P.L., J.L. Shou: Purification and characterization of (Na^+ + K^+)ATPase.
I. The influence of detergents on the activity of (Na^+ + K^+)-ATPase - preparations from the outer medulla of rabbit kidney. Biochim. Biophys. Acta 233:366 (1971).

41a) Jørgensen, P.L.: Regulation of the (Na^+ - K^+)-activated ATP hydrolysing enzyme system in rat kidney. I. The effect of adrenalectomy and the supply of sodium on the enzyme system. Biochim. Biophys. Acta (Aust.) 151:212 (1968).

42. Kaplan, D.M., R.S. Criddle: Membrane structural proteins. Physiol. Review 71(2):249 (1971)

43. Katz, A.I., Epstein, F.H.: Physiological role of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase - the transport of cations across biologic membranes. New Engl. J. Med. 278:253 (1968).

44a) Kinne, R., J.E. Schmitz and E. Kinne-Saffran: The localization of the Na^+-K^+-ATPase in the cells of rat kidney cortex. Pflüg. Arch. 329:191-206 (1971)

44b) Kinne, R., E. Kinne-Saffran: Isolierung und enzymatische Characterisierung einer Bürstensaumfraktion der Rattenniere. Pflüg. Arch. ges. Phys. 308:1 (1969).

45. Kinsolving, C.R., R.L. Post, D.L. Beaver: Sodium plus potassium transport adenosine triphosphatase activity in kidney. J. cell. comp. Physiol. 62:85 (1963).

46. Korn, E.D.: Cell membranes: structure and synthesis. Am. Rev. Biochem. 38:263 (1969).

47. Lamprecht, W., I. Trautschold: Adenosin 5'-triphosphat. Bestimmung mit Hexokinase und Zwischenferment. In: Methoden der enzymatischen Analyse S. 543 . ed H.U. Bergmeyer. Weinheim: Verlag Chemie GmbH 1962

Landon, E.L., J.L. Norris: Sodium and potassium dependent ATPase activity in rat kidney endoplasmatic reticulum fraction. Biochim. Biophys. Acta (Amst) 71:266 (1963).

49. Lengsbed, A.M., W. Hasselbach : Struktur und chemische Asymmetrie von Nierenmembranen.

50. Lineweaver, H., D. Burk: The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Che. Soc. 40:1361 (1931).

51. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265 (1951).

52. Matsui, H., A. Schwartz: Purification and properties of highly active ouabain-sensitive Na^+ - K^+-dependent ATPase from cardiac tissue. Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 128:380 (1966).

53. Mudge, G.H.: Influence of plasma composition on sodium excretion and diuretic action. Ann. N.Y. Acad. Sci. 139:304 (1966).

54. Nakao, T., Y. Tashima, K. Nagano, M. Nakao: Highly specific sodium-potassium activated ATPase from various tissues of rabbit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19:755 (1965).

55. Nechay, B.R., R.F. Palmer, D.A. Chinoy, V.A. Posey: The problem of Na^+ + K^+-adenosinetriphosphatase as the receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid. J. Pharm. exp. Ther. 157:599 (1967).

56. Nelson, J.A., B.R. Nechay: Effects of cardiac glycosides on renal adenosine triphosphatase activity and Na^+ reabsorption in dogs. J. Pharm. exp. Ther. 175:727 (1970).

57. Neville, D.M.: The isolation of cell membrane fraction from rat liver. Biochem. Cytol. 8:413 (1960).

58. Neville, D.M.: Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. Biochim.Biophys.Acta 154:540 (1968).

59. Palmer,R.,B. Nechay: Biphasic renal effects of ouabain in the chicken: correlation with a microsomal Na-K-ATPase.J.Pharm.exp.Ther. 146:92 (1964).

60. Post,R.L.,A.L. Sen, A.S. Rosenthal: A phosphorylated intermediate in ATPase dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. J.Biol.Chem. 240:1437 (1965).

61. Raftell, M., P. Perlmann: Antigen development in submicrosomal fractions of rat liver. Exp.Cell.Res. 57:119 (1969).

62. Ridderstap ,A.S., S.L. Bonting: Na^+ - K^+ activated ATPase and exocrine pancreatic secretion in vitro. Am.J.Physiol. 217:1721, (1969).

63. Santo,N.G. de, H.Ebel, K.Hierholzer: Plasma cell membranes of the rat kidney. II. ATPase activities in adrenalectomized rats with and without steroid hormone substitution. Pflüg.Arch.ges.Physiol. 324:26 (1971).

64. Schmidt, U., K.L. Dubach: The behaviour of Na^+ K^+-activated adenosine triphosphatase in various structures of the rat nephron after Furosemide application.

65. Schultz,E.M., E.J. Gragoe, J.B.Bickins,W.A.Bohlhofer,J.M. Sprague: -unsaturated ketone derivates of corboxy acetic acids, a new class of diuretics. J.Med.Pharma.Chem. 5:660 (1962).

66. Schwartz, A., C.A. Moore: Highly active Na^+, K^+-ATPase in rat submaxillary gland bearing on salivary secretion. Am.J.Physiol. 214:1163 (1968).

67. Skou,J.C.: The influence of some ions on an ATPase from peripheral nerves. Biochim.Biophys.Acta 23:394 (1957).

68. Skou,J.C.: Further investigations on a Mg^{2+} Na^+-activated ATPase, possible related to the active, linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane. Biochim.Biophys.Acta 42:6 (1960).

69. Skou,J.C.: Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+. Biochim. Biophys.Acta 58:314 (1968).

70. Skou, J.L.: Enzymatic aspects of active linked transport of Na and K through the cell membrane. Progress in Biophys.Chem. 14:131 (1964).

71. Skou. J.C. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol.Rev. 45:596 (1965).

72. Smith, E.K.M., A. Czerwinski, J. Citelman, L.C. Welt: The influence of ethacrynic acid on erythrocite ATPase. Clin. Res. 14:388 (1966).

73. Taylor, C.B.: The effect of mercurial diuretics on adenosine triphosphatase of rabbit kidney in vitro. Biochem. Pharm. 12:539 (1963).

74. Ullrich, K.J., K. Baumann, K. Loeschke, C. Rumrich, H. Stolte: Micropuncture experiments with saluretic sulfonamides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 139:416 (1966).

75. Wallach, D.F., V. Vlamovil: Immunological cross-reactivity between plasma membrane and endoplasmic reticulum of Ehrlich ascites carcinoma.

76. Weiner, I.M., R.I. Levy, G.H. Budge: Studies on mercurial diuresis: Renal excretion, acid stability and structure-activity relationships of organic mercurials.

77. Wheeler, K.P., Whittam, R.: Structural and enzymatic aspects of the hydrolysis of ATP by membranes of kidney cortex and erythrcytes. Biochem. J. 93:349 (1964).

78. Whittembury, G., J. Fishman: Relation between cell Na extrusion and transtubular absorption in the perfused toad kidney: the effect of K, ouabain and ethacrynic acid. Pflüg. Arch. ges. Physiol. 307:138 (1969).

79. Yoshitoshi, Y., T. Oda, T. Meda, S. Kume: Effect of mercurial diuretics on electrolyte transport and the ATPase of renal cortex. Proc. 3.rd int. Congr. Nephrol. Washington 1966, Vol. I:269.

80. Zins, G.R., R.A. Wach, R.Z. Gussin and C.R. Ross: The diuretic activity of ethacrynic acid in rats. J. Pharmacol. exp. Ther. 163:210 (1968).

4. Tabellen

Abbildung

	Kontrollen						+ Diuretica					
	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK
Furosemid	2,3 ± 0,05	9,5 ± 1,7	30,3 ± 5,8	10,5 ± 1,8	33,8 ± 4,1	23,3 ± 2,7	5,6 ± 0,6	413,2 ± 66,3	111,4 ± 21,4	13,7 ± 2,4	35,3 ± 3,8	21,5 ± 2,1
Amilorid (einmalig)	1,4 ± 0,1	56,9 ± 8,6	57,2 ± 11,3	6,3 ± 1,0	33,5 ± 4,3	27,0 ± 3,4	3,0 ± 0,2	317,2 ± 22,8	22,0 ± 3,2	4,2 ± 0,5	24,6 ± 2,1	20,5 ± 1,7
Amilorid (chronisch)	1,9 ± 0,1	61,8 ± 14,2	59,1 ± 15,1	6,6 ± 1,2	28,9 ± 4,7	22,3 ± 3,8	2,6 ± 0,2	179,0 ± 34,2	34,3 ± 4,9	4,0 ± 0,8	19,0 ± 2,8	14,8 ± 2,3
Ethacrynsäure	2,3 ± 0,05	9,5 ± 1,7	30,3 ± 5,8	10,5 ± 1,9	33,8 ± 4,1	23,3 ± 2,7	1,8 ± 0,2	12,8 ± 4,9	44,5 ± 14,3	20,3 ± 1,8	46,7 ± 5,4	26,4 ± 4,2

Tab. 1 : Der Einfluß von Diuretica unter in vivo Bedingungen auf das Urinvolumen pro Zeit, Natriurese, Kaliurese und die spezifischen Aktivitäten der ATPasen.

Abkürzungen: $\dot{V}$ = Urinvolumen ml/100 g Körpergewicht

$U_{Na} \cdot \dot{V}$ = Natriumausscheidung in µval/100 g Körpergewicht mal 2 h

$U_K \cdot \dot{V}$ = Kaliumausscheidung in µval/100 g Körpergewicht mal 2 h

ATPase in µ M Pi/mg Protein · h

Es sind die Mittelwerte $\bar{x}$ mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes SE angegeben.

Tab. 2

Einfluß von Diuretica auf die spezifischen Aktivitäten der ATPase unter in vitro Bedingungen. Abkürzungen wie in Tab. 1

	Kontrollen ATPase			+ Diuretica ATPase		
	Mg	MgNaK	NaK	Mg	MgNaK	NaK
Furosemid	3,1 ± 0,3	17,5 ± 1,8	12,7 ± 0,7	4,1 ± 0,4	18,1 ± 1,7	13,0 ± 0,4
Amilorid	3,6 ± 0,5	18,4 ± 1,0	15,4 ± 1,0	2,6 ± 0,4	12,4 ± 0,8	10,2 ± 0,7
Ethacrynsäure	3,7 ± 0,8	17,5 ± 1,4	16,1 ± 1,0	3,3 ± 0,6	12,7 ± 1,2	10,6 ± 1,2

Tab. 3

Der Einfluß von 10^{-3} M/l Amilorid auf die Michaelis-Menten-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit der Mg-ATP-, Na- und K-Aktivierungen unter in vitro Bedingungen.

	Mg-ATP-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrolle	0,91	27,0
	+ Amilorid	0,50	16,1
2. Versuch	Kontrolle	1,11	27,0
	+ Amilorid	0,52	15,3

	Na-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrolle	9,1	31,2
	+ Amilorid	5,3	17,2
2. Versuch	Kontrolle	6,7	12,8
	+ Amilorid	5,0	8,0

	K-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrolle	2,38	27,9
	+ Amilorid	10,00	20,9
2. Versuch	Kontrolle	1,53	15,6
	+ Amilord	20,00	16,9

Tab. 4

Der Einfluß von 10^{-3} M/l Ethacrynsäure auf die Michaelis-Menten-Konstante und die Maximalgeschwindigkeit der Mg-ATP , Na- und K-Aktivierungen unter in vitro Bedingungen.

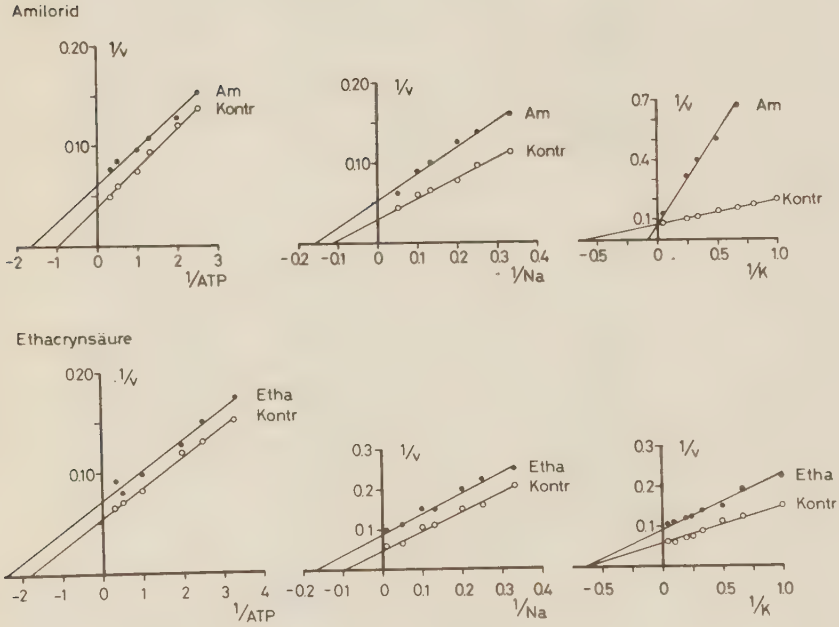
	Mg-ATP-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrollen	0,83	25,0
	+ Ethacrynsäure	0,32	13,8
2. Versuch	Kontrollen	0,63	19,2
	+ Ethacrynsäure	0,46	14,3

	Na-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrollen	5,9	31,2
	+ Ethacrynsäure	4,5	22,2
2. Versuch	Kontrollen	10,0	20,0
	+ Ethacrynsäure	5,5	10,6

	K-Aktivierung		
	Ansatz	K_m	V_{max}
1. Versuch	Kontrollen	1,28	35,7
	+ Ethacrynsäure	1,28	27,0
2. Versuch	Kontrollen	1,43	14,5
	+ Ethacrynsäure	1,43	9,5

Abb. 1

Einfluß von Amilorid und Ethacrynsäure (10^{-3} M/l) auf die Kinetik der MgNaK-ATPase Reaktion (Mittel aus 2 Versuchen) in der Darstellung nach Lineweaver und Burk. *



---

* $\frac{1}{v} = \frac{Km}{\mathring{V}_{max}} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{\mathring{V}_{max}}$

v = Reaktionsgeschwindigkeit uM Pi/mg Prot · h

K_m = Michaelis-Menten Konstante M/l

$\mathring{V}_{max}$ = maximale Reaktionsgeschwindigkeit uM Pi/mg Prot · h.

s = Substratkonz. Mol/l

Tab. 5 Der Einfluß von 100 mg/kg Furosemid auf Diurese, Natriurese und Kaliurese sowie auf die spezifische ATPase Aktivitäten der renalen Plasmamembranen zwei Stunden nach der Gabe per os. Abkürzungen. Spalte I V = Urinvolumen in ml/100 g Körpergewicht. 2 h , Spalte II Natriurese in µVal/100 g · 2 h. Spalte III Kaliurese in µVal/100 g · 2 h, Spalten III-V spezifische ATPase-Aktivitäten in µMPi/mg Protein · h. $\bar{x}$ = Mittelwert, $s_{\bar{x}}$ = mittlerer Fehler des Mittelwertes.

	Kontrolle						+ Furosemid					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Datum	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	ATPase Mg	ATPase MgNaK	ATPase NaK	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	ATPase Mg	ATPase MgNaK	ATPase NaK
15.11. 1967	2.3	8.5	17.3	9.3	32.1	22.8	7.2	542.2	186.7	10.1	30.0	19.9
15.11. 1967	2.3	7.5	33.5	9.2	32.0	22.8	2.6	82.2	115.4	10.5	28.0	17.5
16.11. 1967	2.4	1.9	11.3	7.5	34.8	27.3	7.6	657.0	135.0	12.4	42.0	29.6
16.11. 1967	2.3	9.7	10.0	9.8	42.4	32.6	6.9	560.1	121.0	12.7	42.1	29.4
20.11. 1967	2.3	18.7	31.5	14.6	40.8	26.2	5.9	416.6	19.7	24.5	48.4	23.9
20.11. 1967	2.6	15.7	43.9	21.7	51.9	30.2	5.8	441.8	21.6	23.9	46.8	22.9
21.11. 1967	2.0	6.3	37.2	5.1	14.9	9.8	4.8	386.4	129.5	7.4	21.2	13.8
21.11. 1967	2.4	8.4	57.2	7.1	21.5	14.4	4.2	219.6	162.0	8.2	23.2	15.0
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	2.3 ± 0.05	9.5 ± 1.7	30.3 ± 5.8	10.5 ± 1.8	33.8 ± 4.1	23.3 ± 2.7	5.6 ± 0.6	413.2 ± 66.3	111.4 ± 21.4	13.7 ± 2.4	35.3 ± 3.8	21.5 ± 2.1

Tab. 6 Der Einfluß von 20 mg/kg Amilorid auf Diurese, Natriurese und Kaliurese sowie auf die spezifischen ATPase-Aktivitäten der renalen Plasmamembranen zwei Stunden nach der Gabe p.o. Abkürzungen wie in Tab. 1.

	Kontrollen						+ Amilorid					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Datum	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK
10.6.68	2.1	20.0	11.6	3.2	18.9	15.7	2.6	312.0	11.7	2.3	10.7	8.4
10.6.68	1.9	106.4	26.6	4.2	19.0	15.8	2.5	215.0	16.3	2.0	12.8	10.8
13.6.68	2.1	63.5	26.7	6.2	35.6	29.4	2.9	265.0	23.0	1.6	19.5	17.9
13.6.68	1.2	28.1	14.6	3.4	23.9	20.5	2.9	259.3	12.8	3.4	24.9	21.5
13.6.68	1.5	75.4	126.1	4.9	25.6	20.7	3.4	282.2	23.5	2.0	15.3	13.3
13.6.68	0.9	74.4	24.2	3.8	16.7	12.9	2.0	204.0	6.0	3.9	23.2	19.3
13.6.68	1.2	111.6	88.8	5.4	24.7	19.3	3.0	276.0	21.0	7.4	24.8	17.4
26.6.68	2.2	54.1	55.3	8.3	41.9	33.6	4.0	324.0	8.0	5.5	33.3	27.8
26.6.68	1.4	18.2	9.8	4.9	19.2	13.3	2.9	216.1	5.8	5.5	23.2	17.7
26.6.68	1.5	21.0	13.5	4.3	28.3	24.0	4.0	464.0	44.0	4.4	22.3	17.9
28.6.68	0.7	4.6	55.0	16.6	66.7	50.1	2.9	478.0	23.0	3.6	24.1	20.5
28.6.68	0.4	80.6	119.0	6.9	35.6	28.7	2.3	292.3	16.0	3.8	24.1	20.3
28.6.68	1.4	83.4	130.6	5.4	32.0	26.6	2.5	420.0	30.0	3.4	23.8	20.4
3.7.68	-	-	-	7.2	37.7	30.5	3.9	265.6	42.3	5.0	34.2	29.2
3.7.68	0.8	71.3	79.4	14.7	79.1	64.4	3.8	461.2	22.5	7.2	42.8	35.6
3.7.68	1.1	40.7	75.9	5.3	31.2	25.9	2.2	343.3	46.2	6.4	36.2	29.6
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	1.4 ± 0.1	56.9 ± 8.6	57.2 ±11.3	6.3 ± 0.95	33.5 ± 4.3	27.0 ± 3.4	3.0 ± 0.2	317.2 ± 22.8	22.0 ± 3.2	4.2 ± 0.46	24.6 ± 2.1	20.5 ± 1.7

Tab. 7 Der Einfluß von 20 mg/kg Amilorid über 7 Tage auf Diurese, Natriurese und Kaliurese sowie auf die spezifischen ATPase-Aktivitäten der renalen Plasmamembranen zwei Stunden nach Gabe der letzten Dosis p.o. Abkürzungen wie in Tab. 1.

	Kontrolle						+ Amilorid					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
Datum	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	ATPase MgNaK	NaK
7.6. 1968	-	-	-	9.0	36.9	27.9	-	-	-	5.7	18.3	12.6
7.6 1968	1.4	46.2	65.1	4.7	21.4	16.7	3.2	137.7	40.0	2.2	12.7	10.5
7.6. 1968	1.5	36.7	77.5	4.8	18.1	13.3	1.9	45.0	18.2	2.0	10.0	8.0
10.6. 1968	2.1	20.0	11.6	3.2	18.9	15.7	3.2	211.2	30.2	2.0	14.1	12.1
10.6. 1968	1.9	106.4	26.6	4.2	19.0	14.8	2.8	294.0	25.2	3.9	20.1	16.2
27.6. 1968	1.9	63.0	59.0	9.2	41.2	32.0	2.3	204.0	47.2	7.1	29.5	22.4
27.6 1968	2.3	99.0	115.0	11.0	47.0	36.0	2.2	183.1	45.8	5.4	27.5	22.1
$x \pm s_x$	1.9 ± 0.1	61.8 ± 14.2	59.1 ± 15.1	6.6 ± 1.15	28.9 ± 4.7	22.3 ± 3.8	2.6 ± 0.2	179.0 ± 34.2	34.3 ± 4.9	4.0 ± 0.8	19.0 ± 2.8	14.8 ± 2.3

Tab. 8 Der Einfluß von 50 mg/kg Ethacrynsäure auf Diurese, Natriurese und Kaliurese sowie auf die spezifischen ATPase Aktivitäten der renalen Plasmamembranen zwei Stunden nach Gabe p.o. - Abkürzungen wie in Tab. 1

	Kontrollen						+ Ethacrynsäure					
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI
				ATPase								
Datum	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	MgNaK	NaK	$\dot{V}$	$U_{Na} \cdot \dot{V}$	$U_K \cdot \dot{V}$	Mg	MgNaK	NaK
15.11. 1967	2.3	8.5	17.3	9.3	32.1	22.8	1.8	14.1	24.1	18.9	34.2	15.3
15.11. 1967	2.3	7.5	33.5	9.2	32.0	22.8	0.9	2.2	5.6	21.3	45.3	24.0
16.11. 1967	2.4	1.9	11.3	7.5	34.8	27.3	2.3	8.7	8.5	21.1	69.9	48.8
16.11. 1967	2.3	9.7	10.0	9.8	42.4	32.6	1.6	2.8	1.6	27.8	54.2	26.4
20.11. 1967	2.3	18.7	31.5	14.6	40.8	26.2	2.1	45.7	99.7	25.7	60.5	34.8
20.11. 1967	2.6	15.7	43.9	21.7	51.9	30.2	1.4	15.2	78.5	19.8	51.2	31.4
21.11. 1967	2.0	6.3	37.2	5.1	14.9	9.8	2.4	5.3	45.8	10.4	23.5	13.1
21.11. 1967	2.4	8.4	57.2	7.1	21.5	14.4	1.9	8.5	91.7	17.6	35.1	17.5
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	2.3 ± 0.05	9.5 ± 1.7	30.3 ± 5.8	10.5 ± 1.9	33.8 ± 4.1	23.3 ± 2.7	1.8 ± 0.17	12.8 ± 4.9	44.5 ± 14.3	20.3 ± 1.8	46.7 ± 5.4	26.4 ± 4.2

Tab. 9 Die spezifischen Aktivitäten der ATPase unter dem Einfluß von 10^{-3} M/l Furosemid in vitro.

	Mg-ATPase µM Pi/mg Prot · h		MgNaK-ATPase µM Pi/mg Prot · h		NaK-ATPase µM Pi/mg Prot · h	
Datum	Kontrolle	+ Furosemid	Kontrolle	+ Furosemid	Kontrolle	+ Furosemid
2.5.68	-	-	23.4	24.0	-	-
2.5.68	-	-	29.5	28.6	-	-
13.5.68	-	-	(8.7)	(8.7)	-	-
16.5.68	3.0	5.3	-	-	-	-
17.5.68	5.1	5.5	-	-	-	-
16.7.68	-	-	20.1	20.3	-	-
1.8.68	3.5	3.9	15.9	16.0	12.4	13.1
1.8.68	2.7	4.2	16.1	18.1	13.5	13.9
1.8.68	2.6	4.3	16.4	17.9	13.8	13.7
2.8.68	2.6	4.1	17.0	17.9	14.4	13.7
2.8.68	2.8	2.6	15.1	14.8	12.4	12.2
2.8.68	2.6	3.1	12.4	14.7	9.8	11.6
	-	-	-	-	-	-
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	3.1 ± 0.3	4.1 ± 0.4	17.5 ± 1.8	18.1 ± 1.7	12.7 ± 0.7	13.0 ± 0.4

Tab. 10 Die spezifischen Aktivitäten der ATPasen unter dem Einfluß von 10^{-3} M/l Amilorid in vitro.

Datum	µM Pi/mg Prot · h Kontrolle	+ Amilorid	µM Pi/mg Prot · h Kontrolle	+ Amilorid	µM Pi/mg Prot · h Kontrolle	+ Amilorid
16.5.68	-	-	12.1	9.6	-	-
17.5.68	-	-	18.3	13.3	-	-
23.5.68.	-	-	18.3	13.0	-	-
23.5.68	6.3	4.7	22.6	16.8	16.3	12.1
23.5.68	2.2	1.4	16.0	10.3	13.9	9.0
10.6.68	3.7	2.8	-	-	-	-
10.6.68	3.5	2.6	-	-	-	-
21.6.68	2.8	2.2	19.6	13.4	16.8	11.2
24.6.68	-	-	22.8	17.6	-	-
25.6.68	5.6	3.8	25.4	14.7	19.8	10.9
2.7.68	2.9	2.1	14.8	8.9	11.9	6.8
2.7.68	5.5	1.0	19.1	12.3	12.6	11.3
4.7.68	-	-	16.7	10.5	-	-
16.7.68	3.4	2.6	20.1	12.6	16.8	10.1
17.7.68	-	-	12.9	8.8	-	-
18.7.68	-	-	9.7	7.0	-	-
	-	-	-	-	-	-
$x \pm s_x$	3.6 ± 0.5	2.6 ± 0.1	18.4 ± 1.0	12.4 ± 0.8	15.4 ± 1.0	10.2 ± 0.7
	n=9	n=9	n=13	n=13	n=6	n=6

Tab. 11 Die spezifischen Aktivitäten der ATPasen unter dem Einfluß von 10^{-3} M/1 Ethacrynsäure in vitro

	Mg-ATPase µM Pi/mg Prot · h		MgNaK-ATPase µM Pi/mg Prot · h		NaK-ATPase µM Pi/mg Prot · h	
Datum	Kontrolle	+ Ethacrynsäure	Kontrolle	+ Ethacrynsäure	Kontrolle	+ Ethacrynsäure
20.3.68	-	-	15.7	12.0	-	-
29.4.68	2.2	2.4	15.1	10.6	12.9	8.2
29.4.68	3.9	3.0	-	-	-	-
2.5.68	-	-	16.8	14.6	-	-
10.6.68	1.6	1.6	-	-	-	-
21.6.68	3.3	4.3	18.7	11.1	15.4	6.9
24.6.68	7.4	6.0	25.5	20.2	18.1	14.2
25.6.68	6.3	5.3	26.1	18.6	19.9	13.3
1.7.68	3.1	2.4	18.3	14.7	15.2	12.3
16.7.68	1.5	1.7	16.4	10.8	15.0	9.0
4.7.68	-	-	15.6	12.8	-	-
17.7.68	-	-	12.3	7.8	-	-
18.7.68	-	-	11.5	7.0	-	-
$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	3.71 ± 0.8	3.3 ± 0.6	17.5 ± 1.4	12.7 ± 1.2	16.1 ± 1.0	10.6 ± 1.2
	n=8	n=8	n=11	n=11	n=6	n=6

Lebenslauf

Am 5. Januar 1946 wurde ich als Sohn des Industriekaufmannes Werner Ehrich und seiner Ehefrau Marianne, geb. Borchardt, in Braunschweig geboren. Von Ostern 1952 bis Ostern 1956 besuchte ich die Volksschule am Franzschen Feld in Braunschweig. 1956 bestand ich die Aufnahmeprüfung zur Neuen Oberschule, wo ich im Februar 1965 das Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1965 begann ich das Studium an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. Dort legte ich am 14.3.1966 das Vorphysikum ab und absolvierte am 3.10.1967 das Physikum. Im Wintersemester 1968/69 begann ich als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes ein einjähriges Studium an der Universität Lausanne. Zum Wintersemester 1969/70 kehrte ich an die Freie Universität Berlin zurück und bestand am 5.3.1971 das Medizinische Staatsexamen.

Vom 1.6.71 bis zum 30.9.71 absolvierte ich am Krankenhaus für Schiffs- und Tropenkrankheiten in Hamburg die ersten vier Monate meiner Medizinalpraktikantenzeit. Seit dem 1.10.71 befinde ich mich als Stipendiat des DAAD an der London School of Hygiene and Tropical Medicine, um das "Diploma in Clinical Medicine of the Tropics" zu erwerben.

Zum Abschluß dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Professor Dr.med. K.Hierholzer für die Aufnahme in seinem Institut für Klinische Physiologie bedanken. Herrn Dr.med. H. Ebel und Herrn Dr.med. N. de Santo danke ich für die wertvollen Hinweise und für die Anleitung zur Gestaltung dieser Arbeit.

SOFORTDRUCK BRAUNSCHWEIG

SOFORTDRUCK BRAUNSCHWEIG